مجله به‌زراعی نهال و بذر
جلد ۲-۳۳، شماره ۲، سال ۱۳۹۶

بافت‌شناختی تنش اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن در مقابل پیشرفت عامل بیماری آتشک در ارقام گلابی

Histology of Oxidative Stress and Generation of Reactive Oxygen Species Against Progress of Fire Blight Causal Agent in Pear Cultivars

حمید عبداللهی[1] و زینب صالحی[2]

۱ و ۲- به ترتیب دانشیار و کارشناس ارشد، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۴

چکیده

عبداللهی، ح. و صالحی، ز. ۱۳۹۶. بافت‌شناختی تنش اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن در مقابل پیشرفت عامل بیماری آتشک در ارقام گلابی. **مجله به‌زراعی نهال و بذر ۲-۳۳: ۱۶۲-۱۳۹.**

مقاومت به بیماری آتشک در ارقام گلابی به دو صورت پیشرفت کند بیماری در ارقام نیمه‌مقاوم و توقف سریع بیماری در ارقام مقاوم بروز می‌کند. با توجه به نقش موثر و دوگانه گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، به ویژه سه گونه سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) و هیدروکسیل ($OH^{\cdot-}$) در ایجاد بیماری و دفاع علیه آن، در این تحقیق تولید این گونه‌های فعال اکسیژن در رقم مقاوم درگزی، رقم نیمه مقاوم هاروسوئیت (Harrow Sweet) و رقم حساس ویلیامز (Williams) در واکنش به حمله باکتری *Erwinia amylovora* در شرایط درون‌شیشه‌ای مقایسه شد. سرعت پیشرفت نکروز در شاخه‌چه‌های درون شیشه بر اساس میزان حساسیت رقم در شرایط گلخانه‌ای بود. در هر سه گونه فعال اکسیژن، توسعه بافتی از استوانه مرکزی به سرعت به صورت عمودی آغاز و به تدریج به صورت افقی در پارانشیم ساقه توسعه یافت. دو شاخص شدت و سرعت تولید گونه‌های فعال اکسیژن در پی حمله عامل بیماری منطبق بودند، ولی در رابطه با رادیکال سوپراکسید، ارقام تفاوت قابل توجهی نشان ندادند. با توجه به نقش بازدارنده پراکسید هیدروژن در برابر عامل بیماری، در دو رقم هاروسوئیت و ویلیامز، الگوی تولید و گسترش آن توجیه کننده میزان مقاومت در ارقام بود. همچنین در رقم مقاوم درگزی، بیش‌ترین تاخیر در تولید پراکسید هیدروژن تا ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی مشاهده شد. بر اساس الگوی مشاهده شده تولید گونه‌های فعال اکسیژن، به نظر می‌رسد ارقام مختلف گلابی از مکانیسم‌های متفاوتی برای مقابله با عامل بیماری آتشک استفاده می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: ارقام گلابی، *Erwinia amylovora*، نکروز، هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن، سوپراکسید.

نویسنده مسئول: h.abdollahi@areeo.ac.ir تلفن: ۰۲۶۳۶۷۰۲۵۴۱

مقدمه

بیماری آتشک (Fire blight) با عامل باکتریائی *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow *et al.* 1920، مهم‌ترین بیماری درختان میوه دانه‌دار، به‌ویژه درختان گلابی و به در کشور است (Maroofi and Mostafavi, 1996). این بیماری برای اولین بار در سال ۱۳۶۸ در برغان کرج توسط ذاکری و شریف‌نبی (Zakeri and Sharifnabi, 1991) مشاهده و گزارش شد و به تدریج در بخش‌های گسترده‌ای از کشور از جمله استان‌های قزوین و آذربایجان غربی در سال ۱۳۷۳ گزارش شد (Mazarei *et al.*, 1994) و به تدریج این بیماری در سایر استان‌ها، نظیر خراسان رضوی (Zohur and Rahmani Moghadam, 2004)، گیلان (Ali and Kazempour, 2004) و فارس (Sahandpour and Ghasemi, 2004) مشاهده و سبب خسارت گسترده، به ویژه به درختان گلابی و به شد.

باکتری عامل بیماری، متعلق به خانواده انتروباکتراسه (Entrobacteraceae) و گرم منفی است (van der Zwet and Keil, 1979) و با تولید پروتئین‌های مختلف از جمله HrpA، HrpN، HrpW، AvrRpt2 و HopC1 و پروتئین‌های اختصاصی بیماری (Disease-Specific Proteins) نظیر DspA/E سبب کلونیزه کردن بافت‌ها، ایجاد نکروز و در نهایت مرگ سلولی و پیشرفت بیماری می‌شود (Oh *et al.*, 2010؛ Oh and Beer, 2005). مشخص شده است که تولید گونه‌های مختلف فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species : ROS)، در اثر متقابل ناسازگار (Incompatible) عامل بیماری با گیاهان غیرمیزبان، نظیر توتون و آرابیدوپسیس (Xie and Chen, 2000) و سازگار (Compatible) با گیاهان میزبان (Azarabadi, 2014؛ Venisse *et al.*, 2001) نقش کلیدی در ایجاد علائم بیماری و همچنین ایجاد تحمل و یا مقاومت بر عهده دارند. همچنین گزارش شده که در بین گونه‌های مختلف اکسیژن فعال، نقش پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) بیش‌تر به صورت دفاعی بوده به نحوی که در رقم نیمه متحمل گلابی اسپادونا (Spadona) و سیب متحمل MM111، تولید سریع‌تر پراکسیدهیدروژن سبب کاهش سرعت پیشرفت بیماری در بافت‌های میزبان‌های متحمل‌تر در مقایسه با میزبان‌های حساس می‌شود (Abdollahi *et al.*, 2015). نقش رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\bullet-}$) نیز به عنوان یک رادیکال مخرب در فرآیندهای سلولی به صورت برگشت‌ناپذیر (Bhattacharjee, 2011) و تولید سریع و گسترش زودهنگام‌تر این رادیکال در ارقام حساس‌تر گلابی مشاهده شده است (Azarabadi *et al.*, 2017).

ارزیابی سطح تحمل ارقام مختلف درختان میوه دانه‌دار نسبت به بیماری آتشک در

برنامه‌های تحقیقاتی متعدد در کشور، در رابطه با درختان سیب در شرایط گلخانه‌ای و باغی (Abdollahi and Majidi Heravan, 2005؛ Maleki Balajoo *et al.,* 2011؛ Davoudi, 1998)، در ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به در شرایط گلخانه‌ای و باغی (Abdollahi *et al*., 2008؛ Mehrabipour *et al*., 2010؛ Ahmadi *et al*., 2013) و در ارقام گلابی نیز همانند دو درخت قبلی در هر دو شرایط گلخانه‌ای و باغی (Davoudi, 1998؛ Erfani *et al*., 2013؛ Tahzibi Hagh and Abdollahi, 2009؛ Davoudi *et al*., 2005) انجام شده است. در بررسی‌های انجام شده روی ارقام بومی و وارداتی گلابی، ارقام متعددی به عنوان حساس تا بسیار حساس طبقه‌بندی شدند (Abdollahi, 2010). در بررسی داوودی و همکاران (Davoudi *et al*., 2005) با ارزیابی بیش از چهل رقم گلابی متعلق به گونه *P. communis*، ۶۲/۵ درصد از ارقام بسیار حساس و ۳۷/۵ درصد در گروه حساس و نیمه حساس طبقه‌بندی شدند. همچنین در بررسی عرفانی و همکاران (Erfani *et al*., 2013)، دو رقم درگزی و هاروسوئیت (Harrow Sweet)، به عنوان مقاوم‌ترین ارقام گلابی در شرایط گلخانه‌ای مورد گزینش قرار گرفتند. در مشاهدات باغی رقم گلابی درگزی و همچنین ارزیابی‌های گلخانه‌ای ارقام مختلف گلابی از جمله رقم درگزی (Erfani *et al*., 2013)، مشخص شده که پیشرفت باکتری *E. amylovora* در بافت‌های این رقم متفاوت از ارقام نیمه‌مقاوم نظیر هاروسوئیت و ارقام نیمه حساس نظیر اسپادونا است، به صورتی که باکتری در محل تزریق به بافت‌ها با حداقل تولید بافت‌های آبگزیده متوقف می‌شود. در بررسی عرفانی و همکاران (Erfani *et al*., 2012) در مورد روابط خویشاوندی ارقام و ژنوتیپ‌های گلابی بومی و وارداتی کشور با کمک نشانگر مولکولی توالی‌های ساده تکراری (SSR)، رقم درگزی به صورت کاملاً مجزا از ارقام اروپائی طبقه‌بندی شده و با گلابی چینی گونه *P. bretschneideri*، که این گونه نیز یک هیبرید بین گونه‌ای گونه‌های شرقی گلابی معرفی است، بیش‌ترین قرابت را نشان داد. براساس شواهد اشاره شده در رفتار مقاومت به بیماری رقم درگزی و همچنین منشاء ژنتیکی این رقم بر اساس نشانگرهای مولکولی و نیز محل انتخاب اولیه این رقم بومی از شمال خراسان که در ارقام دیگری نیز دارای قرابت ژنتیکی با گونه‌های شرقی گلابی بوده‌اند، در این تحقیق جزئیات تنش اکسیداتیو و رفتار مقاومتی این رقم مقاوم به بیماری آتشک در مقایسه با دو رقم حساس و نیمه حساس گلابی در سطح تولید گونه‌های رادیکال فعال اکسیژن، در اثر متقابل با باکتری عامل بیماری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جدایه باکتری

بررسی رفتار ارقام گلابی حساس و مقاوم به بیماری آتشک به ترتیب شامل رقم حساس ویلیامز (Williams) با نام معادل بارتلت (van der Zwet and Keil, 1979)، رقم نیمه حساس هاروسوئیت (Harrow Sweet) و رقم مقاوم درگزی (Erfani *et al.*, 2013) در شرایط درون شیشه‌ای با هدف ارزیابی رفتار بافت‌شناختی تولید گونه‌های فعال اکسیژن و در شرایط گلخانه‌ای با هدف مقایسه پیشرفت نهائی نکروز و مقایسه این رفتار با شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شد. برای ارزیابی مقاومت در شرایط درون‌شیشه‌ای، ارقام فوق به با روش کشت ریزقلمه در محیط درون شیشه مستقر شدند. به این منظور، در آغاز فصل بهار سرشاخه‌های نورسته ارقام فوق از گیاهان تهیه و در آزمایشگاه به قطعات تک جوانه تقسیم و بعد از شستشو و سترون کردن، آن‌ها را به ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962)، حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA (Benzyl adenine، (Merck, Catalog no. 101701)، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (1-Naphthylacetic acid) (Merck, Catalog no. 806862)، ۳۰ میلی‌گرم در لیتر سوکروز که با ۰/۶ درصد آگار جامد شده بود، منتقل و سپس در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور (ایجاد شده با لامپ‌های فلئورسنت سفید با شدت نور ۴۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه) و ۸ ساعت تاریکی و در دمای شبانه روزی ۱± ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از استقرار و رشد اولیه شاخه‌چه‌های تازه رشد کرده و فاقد آلودگی، به منظور تسریع در سرعت پرآوری به محیط QL تغییر یافته بر اساس روش پیشنهادی لبلای و همکاران (Leblay *et al.*, 1991) با افزایش میزان کلسیم به ۶/۴ میلی‌مول، آمونیوم به ۷/۵ میلی‌مول و نیترات به ۳۷/۶ میلی‌مول در مقایسه با QL معمولی (Quoirin and Lepoivre, 1977) و با نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد بهینه‌سازی شده برای گلابی‌های گونه .*P. communis* L بر اساس روش عبداللهی و همکاران (Abdollahi *et al.*, 2005) و نورمحمدی و همکاران (Nourmohammadi *et al.*, 2015) شامل ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA، ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2iP (6-γ,γ-Dimethylallylaminopurine، (Sigma-Aldrich, Catalog no. D5912)، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و همچنین ۱ گرم بر لیتر پکتین مرکبات منتقل شدند. همچنین مواد گیاهی مورد استفاده با فواصل زمانی شش هفته یک بار مورد زیر کشت قرار گرفتند.

تکثیر مواد گیاهی سه رقم فوق برای مایه‌زنی در شرایط گلخانه‌ای نیز با استفاده از ارقام موجود فوق در کلکسیون گلابی پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری موسسه تحقیقات علوم باغبانی انجام شد. بدین ترتیب که در

شهریور ماه سال ۱۳۸۸ این ارقام روی پایه گلابی بذری در نهالستان پیوند و گیاهان در شرایط باغ در فصل بهار سال ۱۳۸۹ رشد کردند. در اواخر اسفند همان سال، نهال‌های پیوندی به گلدان‌های ۲۰ کیلویی منتقل و به گلخانه موسسه با نور معمولی و رطوبت ۷۰ تا ۸۵ درصد و دارای سیستم خنک کننده و رطوبت ساز انتقال داده شدند. برای تحریک رشد فرعی جوانه‌ها، سرشاخه‌ها در ارتفاع ۵۰ سانتی‌متری گیاه قطع و نهال‌ها تقریباً به مدت ۶۵ روز در این شرایط نگهداری شدند تا شاخه‌های جدید به اندازه ۲۵ الی ۳۵ سانتی‌متر رشد کردند. نهال‌ها در اواخر اردیبهشت سال ۱۳۹۰ برای مایه زنی باکتری آماده شدند.

پس از تولید ریزشاخه‌ها و گیاهان گلدانی مورد نیاز، به منظور مایه‌زنی با باکتری، ارزیابی میزان و سرعت پیشرفت نکروز و بررسی تولید گونه‌های مختلف اکسیژن فعال در اثر متقابل بین باکتری عامل بیماری آتشک با ارقام گلابی، سویه Ea273 عامل بیماری (ATCC No. 49946, USA) در محیط کشت لوریا- برتانی (LB) مایع، شب‌گذران شد. برای مایه‌زنی مواد گیاهی درون‌شیشه، روش عبداللهی و همکاران (Abdollahi *et al*., 2004) مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور، غلظت زادمایه مورد استفاده در بافر فسفات خنثی (pH برابر ۷) اتوکلاو شده، روی کدورت ۲ (OD = 2) به منظور به حداقل رساندن احتمال فرار سرشاخه‌ها از آلودگی، تنظیم شد. برای کشت توام، ۷۵ میکرولیتر زادمایه به لوله آزمایش حاوی محیط کشت QL افزوده و سپس ریزشاخه‌چه‌های ۳ تا ۴ سانتی‌متری را که دارای طول میانگره‌های یکنواختی بودند، در محیط مستقر شدند. مقایسه سرعت پیشرفت نکروز بر اساس دو شاخص درصد طول شاخه‌چه نکروزه به طول کل شاخه‌چه و درصد میانگره‌های نکروزه به تعداد کل میانگره‌ها در بازه زمانی پس از آلوده‌سازی بر اساس حداکثر زمان مورد نیاز برای رسیدن نکروز به صددرصد در شاخه‌چه‌های هر دو رقم گلابی و با فواصل زمانی ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای ارزیابی فعالیت باکتری در محیط رشد که سبب اُفت سریع pH در مقایسه با گیاه می‌شود، محلول مادری نشانگر برموکرزول سبز (Green bromo cersol) با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر به محیط‌های کشت اضافه شد. تغییرات pH محیط با استفاده از محلول‌های استاندارد pHحاوی نشانگر فوق به صورت مقایسه‌ای در طول آزمایش‌ها بر اساس سیستم ارزیابی اثر متقابل باکتری عامل بیماری آتشک و گلابی (Abdollahi *et al*., 2004) ردیابی شد. کلیه آزمایش‌ها در پنج تکرار انجام و محاسبات آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل (Microsoft Excel-USA, 2003) انجام شد.

برای بررسی میزان پیشرفت نهائی نکروز در سرشاخه‌های نهال‌های گلدانی این ارقام، زادمایه

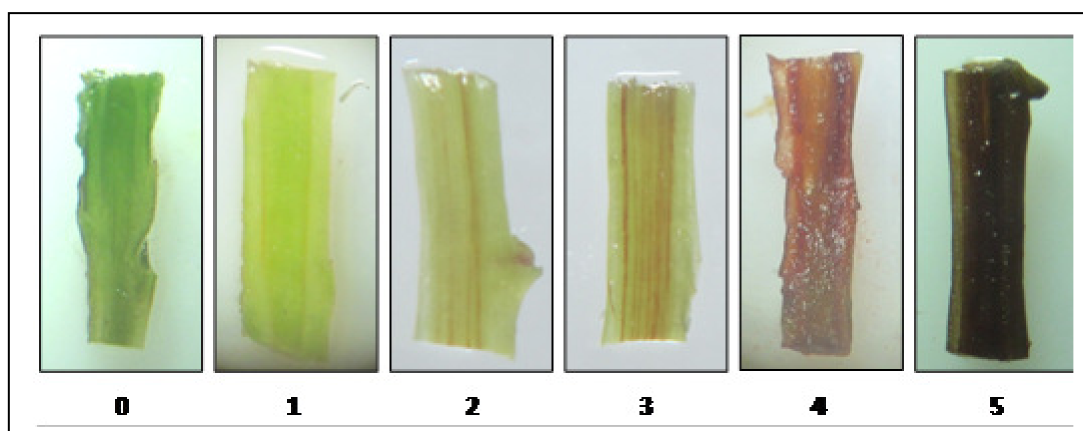
آماده شده به روش فوق، به میزان یک میلی‌لیتر و با استفاده از سرنگ انسولین به سرشاخه‌های درحال رشد و چوبی نشده مایه‌زنی شدند. آلوده‌سازی سرشاخه‌ها به تعداد پنج تکرار در هر گلدان و سه گلدان برای هر رقم انجام شد. همچنین در تیمار شاهد، از هر گلدان یک شاخه با آب مقطر استریل به منظور بررسی تولید نکروز تزریق شدند.

ارزیابی پراکسیدهیدروژن (H_2O_2)

آزمایش بررسی تولید پراکسیدهیدروژن در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت پس از مایه‌زنی باکتری عامل بیماری، با استفاده از DAB (Diaminobenzidine) مطابق روش توردال-کریستانسن و همکاران (Thordal-Christansen *et al*., 1997) بررسی شد. شاهد این آزمایش، شاخه‌چه‌های درون شیشه بود که باکتری عامل بیماری را دریافت نکرده بودند. بدین صورت که در زمان‌های فوق، از هر رقم سه شاخه‌چه درون شیشه برداشت و از پایین تا انتهای ساقه در قطعات ۵ میلی‌متری با اسکالپل برش داده شدند. پس از آن، هر قطعه به طور مجزا داخل میکروتیوب حاوی محلول DAB انداخته و به مدت ۳۰ الی ۴۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور قرار گرفتند. سپس قطعات ۵ میلی‌متری شاخه‌چه از هر تیوب خارج و با اسکالپل به صورت طولی به دو قسمت برش داده و زیر بینوکولر مورد بررسی و عکس‌برداری قرار گرفتند. با تغییر رنگ بافت شاخه‌چه‌های درون شیشه در ساعات مختلف، سرعت و شدت تولید پراکسید هیدروژن مورد بررسی و یادداشت‌برداری قرار گرفت. همچنین شدت تولید پراکسید هیدروژن بر اساس درجه شدت تولید از الگوی صفر تا ۵ (صفر: شاهد بدون علائم تولید پراکسید هیدروژن، ۱: صورتی، ۲: قرمز، ۳: قرمز تیره، ۴: قهوه‌ای، ۵: قهوه‌ای تیره) اندازگیری (شکل ۱) و سپس با استفاده از دو شاخص اندازگیری سرعت و شدت تولید، پراکسیدهیدروژن مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی رادیکال سوپراکساید (O_2^-)

بررسی سرعت و شدت تولید سوپراکساید در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت ساعت پس از مایه‌زنی باکتری عامل بیماری، با استفاده از NBT (Nitro blue tetrazolium) مطابق روش لدانف و همکاران (Le Deunff *et al*., 2004) در سه تکرار و مشابه با آزمایش تولید پراکسیدهیدروژن انجام شد. در این بررسی نیز شاهد، شاخه‌چه‌های درون شیشه بود که باکتری عامل بیماری را دریافت نکرده بودند. برای بررسی تولید و ارزیابی شدت رادیکال سوپراکسید، ساقه‌چه‌های درون شیشه ارقام گلابی در محلولی حاوی ۰/۰۵ درصد NBT و ۰/۰۵ مولار بافر فسفات سدیم با pH = ۷ (شامل ۱۱۷ میلی‌لیتر از NaH_2PO_4 به همراه ۱۸۳ میلی لیتر Na_2HPO_4)



شکل ۱- الگوی مورد استفاده برای امتیازدهی حضور علائم تولید گونه‌های فعال اکسیژن در بافت‌های مختلف شاخه‌چه‌های درون شیشه ارقام گلابی

امتیاز صفر (شاهد)	بدون رد حضور رادیکال‌ها (شاخه‌چه سبز)
امتیاز ۱ (علائم بسیار کم)	رد بسیار کم در حاشیه استوانه مرکزی
امتیار ۲ (علائم کم)	رد کم ر تمامی مناطق استوانه مرکزی
امتیاز ۳ (علائم متوسط)	رد متوسط در استوانه مرکزی و پارانشیم
امتیاز ۴ (علائم زیاد)	رد قابل توجه در تمامی بافت‌های شاخه‌چه
امتیاز ۵ (علائم بسیار زیاد)	رد بسیار شدید در تمامی بافت‌های شاخه‌چه

Fig. 1. Pattern used for scoring generation of reactive oxygen species in various tissues of *in vitro* shootlets of pear cultivars

Score 0 (Control)	No traces of radicals (Green shootlets)
Score 1 (Very light traces)	Light traces in margins of central cylinder
Score 2 (Light traces)	Light traces in entire central cylinder
Score 3 (Moderate traces)	Moderate traces in central cylinder and parenchyma
Score 4 (High traces)	Significantly high traces in entire shootlet tissues
Score 5 (Very high traces)	Very severe traces in entire shootlet tissues

به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط خلاء قرار گرفتند و ساقه‌چه‌ها در زیر بینوکولر همانند روش اشاره شده برای پراکسیدهیدروژن بررسی شدند.

ارزیابی رادیکال هیدروکسیل (OH^-)

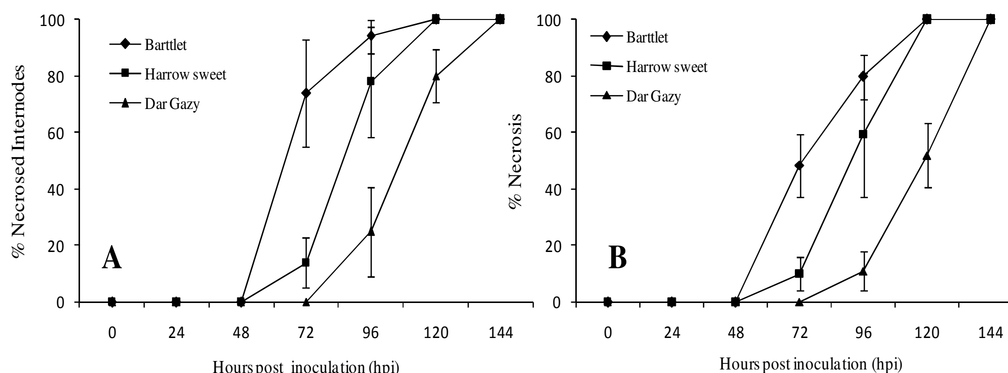
آزمایش بررسی سرعت و شدت تولید رادیکال هیدروکسیل در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی باکتری عامل بیماری، مطابق روش کلین و همکاران (Klein *et al.*, 1981) در سه تکرار و مشابه با دو گونه دیگر اکسیژن فعال بررسی شد. در این بررسی نیز شاهد، شاخه‌چه‌های درون شیشه بود که باکتری عامل بیماری را دریافت نکرده بودند. برای تهیه محلول مادری محلول نشانگر رادیکال هیدروکسیل، در مرحله اول یک میلی‌لیتر از محلول iron-EDTA (شامل ۰/۱۳ درصد فروس آمونیوم سولفات و ۰/۲۶ درصد از EDTA) برداشت شده و در مرحله دوم ۰/۵ میلی‌لیتر EDTA به همراه یک میلی‌لیتر DMSO به محلول فوق اضافه شد. در

مرحله سوم، ۰/۵ میلی‌لیتر از اسید آسکوربیک ۲۲ درصد به محلول‌ها اضافه و در مرحله چهارم، مواد گیاهی موجود در میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط خلاء قرار داده و در مرحله پنجم، یک میلی‌لیتر از محلول TCA فوق سرد به آن اضافه شد و سپس ۳ میلی‌لیتر از ماده Nash reagent (شامل ۷۵ گرم آمونیوم استات، ۳ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال، ۲ میلی‌لیتر استیل استون به همراه ۱ میلی‌لیتر آب مقطر) به میکروتیوب‌ها اضافه و دوباره به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط خلاء قرار داده شدند تا اجازه رنگ‌آمیزی به بافت‌ها و ردیابی حضور رادیکال هیدروکسیل در بافت‌ها فراهم شود. سرعت و شدت تولید رادیکال هیدروکسیل در شاخه‌چه‌های درون شیشه ارقام گلابی در زیر بینوکولر همانند روش مورد استفاده برای دیگر گونه‌های فعال اکسیژن این تحقیق، مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

پیشرفت بیماری در شاخه‌چه‌های درون شیشه

نتایج بیانگر موفقیت کامل مایه‌زنی در سه رقم مورد آزمایش در محیط درون‌شیشه‌ای بود و در هیچ یک از شاخه‌چه‌های مایه‌زنی شده با باکتری عامل بیماری، فرار از آلودگی مشاهده نشد. همچنین هیچ یک از شاخه‌چه‌های شاهد، علائم نکروز نشان ندادند. از سوی دیگر، با توجه به انتخاب سه رقم با میزان حساسیت متفاوت نسبت به بیماری، اولین علائم در رقم حساس به آتشک ویلیامز و نیمه مقاوم هاروسوئیت پس از گذشت ۴۸ ساعت از مایه‌زنی مشاهده شد، با این تفاوت که پس از این مرحله، پیشرفت نکروز با سرعت بیش‌تری بر اساس هردو شاخص سرعت پیشرفت نکروز و درصد میانگره‌های نکروزه در رقم ویلیامز ادامه پیدا کرد (شکل‌های ۲ و ۳). بر خلاف دو رقم فوق، اولین علائم نکروز بیماری در رقم مقاوم درگزی، با ۲۴ ساعت تاخیر در شاخه‌چه‌های درون شیشه مشاهده و با تاخیر قابل توجه ادامه یافت (شکل ۲). ظهور اولین علائم بیماری در رقم درگزی ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی و تاخیر در پیشرفت نکروز در این رقم، با نتایج قبلی عبداللهی و همکاران (Abdollahi *et al*., 2004) که نشان دهنده این است که در شرایط درون شیشه، مقاومت به بیماری به صورت تاخیر در پیشرفت علائم ظهور می‌کند، منطبق است. در اصل در این شرایط، به دلیل عدم وجود بافت‌های چوبی و سدهای لیگنینی بافت‌ها از یک سو و از سوی دیگر رطوبت بالا و شرایط بسیار مساعد رشد باکتری، ارقام مقاوم به بیماری، تنها مقاومت خود را به صورت تاخیر در پیشرفت بیماری نشان می‌دهند. این در حالی است که در شرایط ارزیابی گلخانه‌ای، به دلیل وجود بافت‌های چوبی، عدم وجود شرایط صد در صد مطلوب برای پیشرفت بیماری نظیر رطوبت نسبتاً پائین‌تر و عدم وجود محیط کشت در محیط رشد و نمو باکتری، مقاومت نسبی به بیماری، به صورت



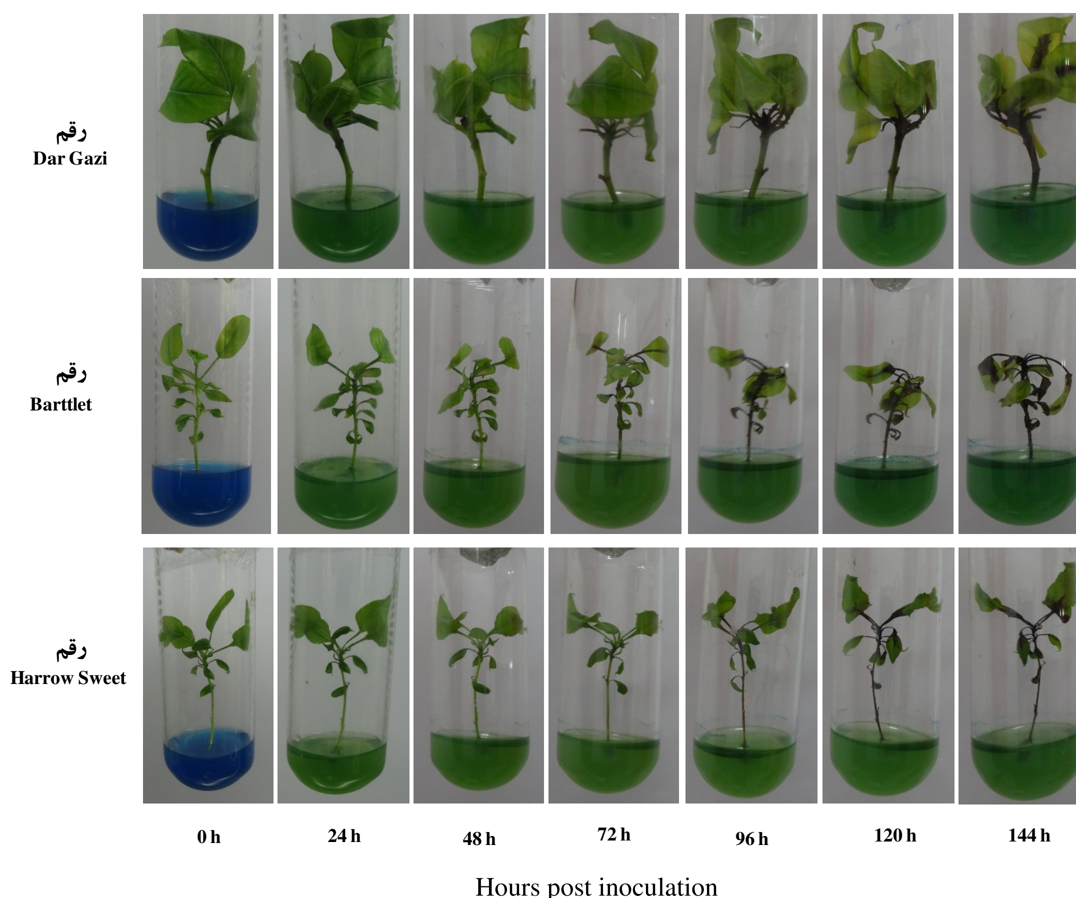
شکل ۲- مقایسه پیشرفت نکروز حاصل از عامل بیماری آتشک، *Erwinia amylovora* بر اساس دو شاخص درصد میانگره‌های نکروزه (چپ) و درصد طول شاخه نکروزه (راست) در شاخه‌چه‌های درون شیشه رقم حساس به آتشک بارتلت و دو رقم مقاوم به آتشک درگزی و هاروسوئیت. ارزش‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندار، بیان شده است.

Fig. 2. Comparison of the necrosis progress caused by fire blight causal agent, *Erwinia amylovora*, in *in vitro* shootlets according to percentage of necrosed internodes (left) and percentage of necrosed shootlet length in susceptible cultivar Bartlett, and two resistant cultivars Dar Gazi and Harrow Sweet. The values are means ± standard errors.

توقف نسبتاً سریع عامل بیماری در بافت‌های آلوده شده در طی چند روز پس از تلقیح خودنمائی می‌کند (Erfani *et al*., 2013). بر همین اساس، ارزیابی مقاومت در شرایط درون شیشه‌ای بر اساس سرعت پیشرفت نکروز، در شرایط گلخانه‌ای نه‌تنها بر اساس سرعت پیشرفت نکروز، بلکه براساس درصد پیشرفت نکروز در سرشاخه‌های آلوده شده و در شرایط باغی، به دلیل وجود درخت کامل و شاخه‌هائی با سنین مختلف، علاوه بر اساس شاخص‌های قبلی، بر اساس شاخص‌های متعدد دیگری نظیر فراوانی سرشاخه‌های آلوده (Ahmadi *et al*., 2013) و عمق نفوذ عامل بیماری در بافت‌های دو، سه و چهار ساله و بیش‌تر (van der Zwet and Keil, 1979) امکان‌پذیر است. تاخیر قابل‌توجه پیشرفت علائم بیماری در رقم درگزی با مقاومت بالا مشاهده شده در شرایط باغی و گلخانه‌ای (Erfani *et al*., 2013) کاملاً منطبق است. علاوه بر این، خشکیدگی و سیاه شدن برگ‌ها در شرایط درون‌شیشه به دلیل عدم وجود تبخیر و تعرق حتی پس از گذشت ۱۴۴ ساعت از مایه‌زنی مشاهده نشد و پیشرفت باکتری تنها در دمبرگ و بخش‌هائی از قاعده برگ اتفاق افتاد (شکل ۳) که با گزارش قبلی عبداللهی و همکاران (Abdollahi *et al*., 2004) همخوانی دارد.

پیشرفت بیماری در شرایط گلخانه‌ای

نتایج ارزیابی‌های گلخانه‌ای نشان‌دهنده



شکل ۳- مقایسه پیشرفت نکروز حاصل از عامل بیماری آتشک، *Erwinia amylovora* در شاخه‌چه‌های درون شیشه رقم حساس به آتشک بارتلت و دو رقم مقاوم به آتشک درگزی و هاروسوئیت. رشد باکتری عامل بیماری به صورت افت pH محیط از رنگ آبی (۵/۲) به سبز (کم‌تر از ۵) مشخص شده است.

Fig. 3. Comparison of the necrosis progress caused by fire blight causal agent, *Erwinia amylovora*,, in susceptible cultivar, Bartlett, and two resistant cultivar, Dar Gazi and Harrow Sweet. The growth of bacterial causal agent is determined by pH decline from blue (5.2) to green (lower than 5).

موفقیت کامل مایه‌زنی در سه رقم مورد آزمایش در شرایط گلخانه‌ای بود و همانند شرایط درون‌شیشه‌ای، فرار از بیماری در هیچ یک از سرشاخه‌های مایه‌زنی شده مشاهده نشد. همچنین علائم نکروز در شاهدهای تزریق شده با آب مقطر استریل دیده نشد. با توجه به میزان حساسیت ارقام مورد بررسی، اولین علایم در شرایط گلخانه‌ای، به صورت آبگزیدگی محل تزریق باکتری طی ۲ تا ۳ روز بعد از مایه‌زنی باکتری آشکار و بسته به حساسیت رقم، بیماری به میزان متفاوتی در سرشاخه‌ها پیش رفت. میزان پیشرفت نهائی نکروز در ارقام پس از حدود گذشت ۱۴ روز متوقف شد (شکل ۴). بر اساس شدت حساسیت رقم، در رقم حساس ویلیامز،



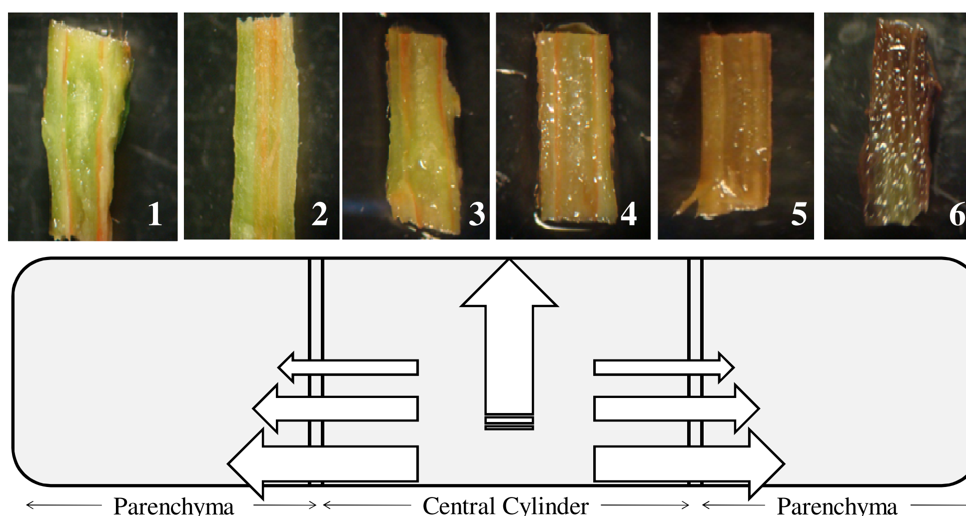
شکل ۴- مقایسه پیشرفت نهائی نکروز حاصل از باکتری عامل بیماری آتشک، *Erwinia amylovora*. در سرشاخه‌های سه رقم حساس به بیماری ویلیامز (A)، نیمه مقاوم هاروسوئیت (B) و مقاوم درگزی (C) چهارده روز پس از مایه‌زنی عامل بیماری در شرایط گلخانه

Fig. 4. Comparison of final progress of fire blight causal agent (*Erwinia amylovora*) necrosis in the shoots of susceptible cultivar Williams (A), moderately resistant cultivar Harrow Sweet (B) and resistant cultivar Dar Gazi (C), following 14 days post inoculation of causal agent in greenhouse condition

میزان پیشرفت در سرشاخه‌ها تا انتهای محل اتصال آن به تنه اصلی، در رقم نیمه مقاوم هاروسوئیت تا بخش فوقانی سرشاخه در حال رشد و بدون رسیدن به بخش تحتانی شاخه و در رقم مقاوم درگزی، تنها به صورت بروز نکروز لکه‌ای در حاشیه محل تزریق باکتری دیده شد (شکل ۴). نتایج این بخش از تحقیق در انطباق با مشاهدات باغی از میزان حساسیت ارقام فوق به بیماری بود و با بررسی گلخانه‌ای حساسیت به آتشک ارقام گلابی توسط عرفانی و همکاران (Erfani *et al.*, 2013) همخوانی دارد. از طرفی، این تفاوت در رفتار ارقام در شرایط درون‌شیشه‌ای و گلخانه‌ای تایید کننده این است که، ارزیابی مقاومت در شرایط درون‌شیشه‌ای بر اساس سرعت پیشرفت نکروز در شاخه‌چه‌ها و در شرایط گلخانه‌ای براساس میزان پیشرفت نهائی نکروز در شاخه‌های مایه‌زنی شده امکان پذیر بوده و نتایج حاصل از دو شرایط فوق در این گونه تا حد زیادی با یک دیگر منطبق است.

تولید و گسترش گونه‌های فعال اکسیژن

در پی ساعت‌های پس از مایه‌زنی شاخه‌چه‌های درون شیشه ارقام ویلیامز، هاروسوئیت و درگزی با عامل بیماری آتشک، اولین علائم تنش اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن در محل کامبیوم آوندی (Vascular cambium) به صورت رگه‌رگه مشاهده (شکل ۵) و سپس تنش اکسیداتیو کل کامبیوم آوندی را به صورت احاطه کامل استوانه مرکزی (Central cylinder) در بر گرفت. همچنین هیچ گونه تنش اکسیداتیوی در تیمارهای شاهد که باکتری را دریافت نکرده بودند مشاهده نشد. وجود اولین علائم تولید گونه‌های فعال اکسیژن در این بافت‌ها به طور یکنواخت برای هر سه گونه، سوپراکسید



شکل ۵- روند گسترش افقی (بالا) و الگوی گسترش عمومی (پائین) پراکسید هیدروژن حاصل از عامل حمله عامل بیماری آتشک، *Erwinia amylovora* در بافت‌های شاخه‌چه‌های درون شیشه ارقام گلابی

Fig. 5. Procedure of horizontal expansion (upper) and pattern of general expansion (lower) of hydrogen peroxide following attack of fire blight causal agent, *Erwinia amylovora* in the tissues of the *in vitro* shootlets of pear cultivars

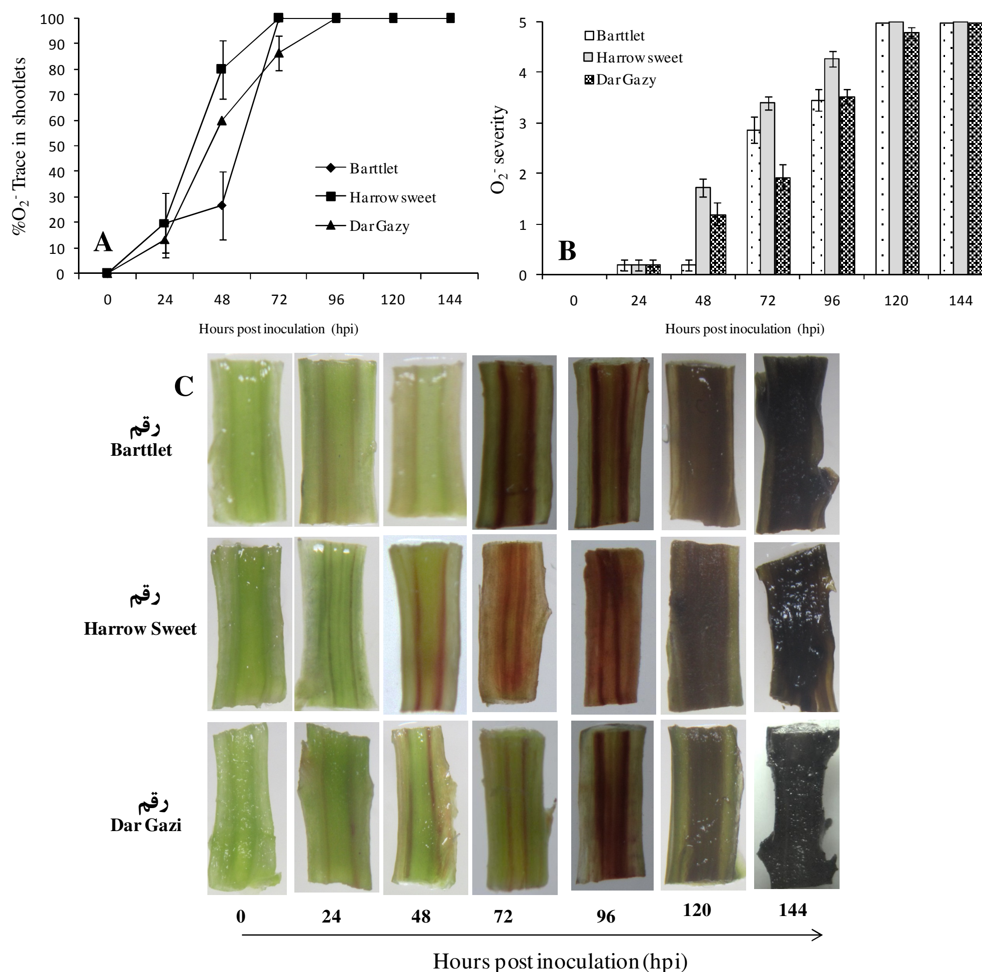
($O_2^{\bullet-}$)، پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) و هیدروکسیل ($OH^{\bullet-}$) دیده شد. مشاهده اولین علائم تولید گونه‌های فعال اکسیژن در محل کامبیوم آوندی، با توجه به ماهیت پیشرفت این باکتری در بافت‌های آوندی گیاه میزبان، به صورتی که هر دو بافت آوند چوبی (Aldwinckle and Preczewski, 1976) و آبکش (Gowda and Goodman, 1970) به عنوان مسیرهای پیشرفت باکتری در میزبان مورد گزارش قرار گرفته‌اند، دور از انتظار نیست. در پی ظهور و پیشرفت علائم گونه‌های فعال اکسیژن در ناحیه کامبیوم آوندی به صورت عمودی، به تدریج گسترش این علائم به صورت خفیف و سپس شدیدتر به صورت افقی در پارانشیم استوانه مرکزی و پارانشیم کورتکس (Cortical parenchyma) مشاهده شد (شکل ۵). این نتایج نیز با گزارش‌های ارائه شده در رابطه با کلونیزه کردن بافت‌های مجاور بافت‌های آوندی به ویژه پارنشیم آوندی مجاور بافت‌های آوند چوبی و آبکش توسط باکتری عامل بیماری آتشک و همچنین گسترش افقی آن در ساقه از طریق پارانشیم کورتکس (Steiner, 2000) منطبق است. همچنین بر اساس رده امتیازدهی ارائه شده در شکل ۱، به منظور مقایسه شدت تولید گونه‌های فعال اکسیژن در بافت‌های ساقه‌چه‌های درون شیشه، مشاهده شد که رده‌های پائین شدت تولید گونه‌های فعال اکسیژن، بیش‌تر با ظهور علائم

آبگزیدیی و رده‌های بالای آن بیش‌تر با ظهور علائم نکروز در بافت‌های میزبان همراه است.

تولید و گسترش رادیکال سوپراکسید

مقایسه تولید و گسترش رادیکال سوپراکسید بر اساس دو شاخص سرعت و شدت نشانگر این نشان داد که در هر سه رقم گلابی شامل رقم مقاوم درگزی، رقم نیمه مقاوم هاروسوئیت و رقم حساس ویلیامز الگوی نسبتاً مشابهی برای شاخص سرعت گسترش این رادیکال در هر سه رقم مشاهده شد (شکل ۶). به این صورت که این رادیکال از ساعت‌های ابتدائی پس از مایه‌زنی با عامل بیماری در بافت‌ها تولید و در دو رقم هاروسوئیت و ویلیامز در ۴۸ ساعت بعد بیش از ۶۰ تا ۷۰ درصد طول شاخه‌چه‌های درون شیشه دارای رد این رادیکال بودند. در همین زمان درصد گسترش این رادیکال در رقم مقاوم درگزی، کم‌تر از دو رقم دیگر بود و متعاقب آن الگوی گسترش مشابهی داشتند (شکل ۶). همچنین بر اساس الگوی شدت گسترش رادیکال سوپراکسید، رقم درگزی در ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی، دارای شدت کم‌تری از این رادیکال بود (شکل ۶). از طرف دیگر، الگوی تولید رادیکال سوپراکسید در کامبیوم آوندی و پیشرفت آن در طول استوانه مرکزی به طور عمودی و پس از آن، گسترش افقی آن در پارانشیم‌های مجاور شاخه‌چه‌های درون شیشه هر سه رقم به طور کم و بیش مشابهی دیده شد. نمونه‌های شاهد نیز هیچ ردی از تولید این رادیکال حتی پس از گذشت ۱۴۴ ساعت نشان ندادند.

رادیکال سوپراکسید به طور معمول در کلیه بافت‌های زنده در اثر پدیده تنفس سلولی و فتوسنتز به ترتیب در زنجیره‌های انتقال الکترون میتوکندریائی و کلروپلاستی به میزان محدودی تولید و در اثر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (Superoxide dismutase) به گونه فعال اکسیژن کم‌تر فعال و کم‌خطر، پراکسیدهیدروژن تبدیل می‌شود (Bhattacharjee, 2011). این رادیکل به عنوان پیشاز تبدیل به پراکسیدهیدروژن و پس از آن رادیکال خطرناک و مخرب هیدروکسیل برای بافت‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در بررسی آذرآبادی و همکاران (Azarabadi *et al.*, 2017)، به طور مشابهی، تفاوت قابل‌توجهی بین میزان تولید رادیکال سوپراکسید، در ارقام حساس و مقاوم گلابی مشاهده نشد. بر این اساس، به نظر می‌رسد که در این مرحله، تاثیر عامل بیماری در ارقام حساس و مقاوم نسبتاً مشابه بوده و هنوز گیاه توان بیان مکانیسم‌های مورد نظر را برای بروز واکنش‌های ویژه خود در ارقام حساس و یا مقاوم نداشته است. از طرفی بررسی آذرآبادی و همکارن (Azarabadi *et al.*, 2017) روی تظاهر ژن کد کننده آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (*SOD*) در ارقام حساس و مقاوم گلابی به بیماری آتشک در پی حمله عامل بیماری، نشان داد که ارقام حساس تظاهر بسیار بیش‌تری در



شکل ۶- مقایسه سرعت (A) و شدت (B) پیشرفت رادیکال فعال اکسیژن سوپراکسید ($O_2^{\bullet -}$) و الگوی مشاهده شده در بافت‌های ساقه‌چه‌های درون شیشه (C) در ارقام گلابی مورد مطالعه پس از آلوده‌سازی با عامل بیماری آتشک، *Erwinia amylovora*، در دوره زمانی ۱۴۴ ساعت پس از مایه‌زنی

Fig. 6. Comparison of velocity (A) and severity (B) of superoxide ($O_2^{\bullet -}$) radical progress in the tissues of *in vitro* shootlets of studied pear cultivars and pattern of progress (C), following inoculation by fire blight causal agent, *Erwinia amylovora*, up to 144 h post inoculation period

مقایسه با ارقام مقاوم در ساعت‌های بعد از مایه‌زنی نشان دادند. این نتایج بیانگر این است که ارقام حساس، ظاهراً بایستی از توان تولید رادیکال سوپراکسید بالاتری در مقایسه با ارقام مقاوم برخوردار بوده، لیکن تظاهر

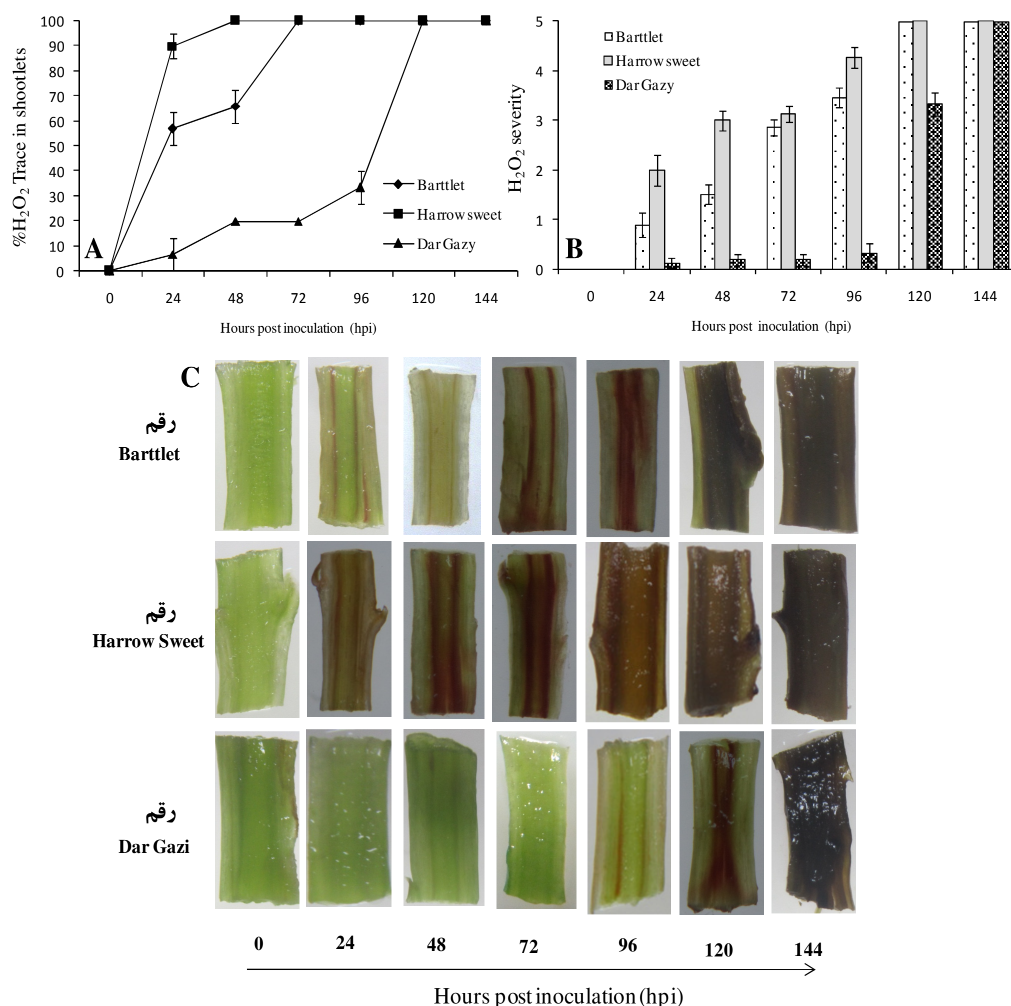
بالای ژن کد کننده آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و در پی آن فعالیت بیش‌تر آنزیمی سوپراکسیددیسموتاز که سبب کاهش سطح رادیکال سوپراکسید در گیاه می‌شود، سبب یکنواخت کردن نسبی سطح این

رادیکال در ارقام حساس و متحمل به بیماری شده است.

تولید و گسترش پراکسیدهیدروژن

بررسی و مقایسه سرعت و شدت تولید و گسترش گونه فعال اکسیژن پراکسیدهیدروژن، برخلاف رادیکال سوپراکسید، نشان دهنده وجود تفاوت قابل‌توجه در هردو شاخص مورد استفاده بود. بر این اساس که ارقام گلابی مورد آزمایش سه نوع پاسخ تولید و گسترش سریع و شدید پراکسیدهیدروژن در رقم نیمه مقاوم هاروسوئیت، تولید و گسترش نسبتاً کندتر و خفیف‌تر پراکسیدهیدروژن در رقم حساس ویلیامز و الگوی تولید و گسترش بسیار دیر و بسیار خفیف‌تر پراکسیدهیدروژن در رقم مقاوم درگزی، نشان دادند (شکل ۷). گزارش‌ها نشان داده است که در بین گونه‌های مختلف اکسیژن فعال، پراکسیدهیدروژن کم‌خطرترین نوع آن‌ها بوده و بافت‌های زنده، ازجمله گیاهان، برای فرار از اثر مخرب رادیکال‌هائی نظیر سوپراکسید، با استفاده از آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، اقدام به تبدیل این رادیکال به پراکسیدهیدروژن می‌کنند (Bhattacharjee, 2011). علاوه بر این، گیاهان از جمله ارقام گلابی از تولید زودهنگام و زیاد پراکسیدهیدروژن، به عنوان یک سد دفاعی برای پیشرفت عامل بیماری آتشک در بافت‌های خود استفاده می‌کنند (Abdollahi *et al.*, 2015؛ Azarabadi *et al.*, 2017). نتایج مشاهده شده در این بخش تحقیق در رابطه با دو رقم ویلیامز و هاروسوئیت، با نتایج قبلی در انطباق کامل است. لیکن در رقم مقاوم به بیماری آتشک درگزی، که از جنبه قرابت ژنتیکی متمایز از دیگر ارقام گلابی متعلق به گونه گلابی معمولی یا *P. communis* تشخیص داده شده است (Erfani *et al.*, 2012)، رفتار کاملاً متفاوتی از نظر تولید پراکسیدهیدروژن مشاهده شد. به این صورت که، در این رقم برخلاف رقم نیمه مقاوم هاروسوئیت که با استفاده از تولید سریع و زودهنگام پراکسیدهیدروژن، تلاش در مهار بیماری در بافت‌های خود کرده است، در این‌جا واکنش رقم درگزی به صورت بی‌تفاوتی و عدم واکنش سریع به حضور باکتری تظاهر پیدا کرده است. لازم به ذکر است که، بر اساس نتایج حاصل از ردیابی رادیکال سوپراکسید، ارقام مختلف مورد بررسی، از جمله رقم درگزی، تفاوت زیادی در سرعت تولید این رادیکال نشان ندانند (شکل ۶). لذا این بدان معنی‌است که رقم مقاوم درگزی همانند دو رقم دیگر گلابی ویلیامز و هاروسوئیت قادر به تشخیص و واکنش سریع اولیه به حضور باکتری در سطح بافت‌های خود بوده است، لیکن در مرحله بعدی این واکنش به صورت عدم تمایل به تولید زودهنگام و بیش از حد زیاد پراکسیدهیدروژن در این رقم نمودار شده است (شکل ۷).

گیاهان از آنزیم‌های کاتالاز و انواع مختلف پراکسیدازها استفاده می‌کنند تا



شکل ۷- مقایسه سرعت (A) و شدت (B) پیشرفت گونه فعال اکسیژن پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و الگوی مشاهده شده در بافت‌های ساقه‌چه‌های درون شیشه (C) در ارقام گلابی مورد مطالعه پس از آلوده‌سازی با عامل بیماری آتشک، *Erwinia amylovora* در دوره زمانی ۱۴۴ ساعت پس از مایه‌زنی

Fig. 7. Comparison of velocity (A) and severity (B) of hydrogen peroxide (H_2O_2) progress in the tissues of *in vitro* shootlets of studied pear cultivars and pattern of progress (C), following inoculation by fire blight causal agent, *Erwinia amylovora*, up to 144 h post inoculation period

پراکسیدهیدروژن بیش از حد تجمع یافته در بافت‌های خود را به مولکول آب تبدیل کنند (Bhattacharjee, 2011)، به این دلیل که در غیر این صورت، پراکسیدهیدروژن به عنوان پیش‌سازی مورد استفاده واکنش فنتون‌هاربر (Fenton-Harber) قرارگرفته و به رادیکال خطرناک و مخرب هیدروکسیل تبدیل می‌شود (Halliwell and Gutteridge, 1999). بر این اساس مشاهده می‌شود که گونه فعال اکسیژن پراکسیدهیدروژن می‌تواند به دو صورت مفید و

مخرب نقش ایفا کند. بدین ترتیب که، با افزایش نسبی تولید به عنوان سدی در برابر عوامل بیماری‌زا و راهی برای فرار از اثر مخرب رادیکال سوپراکسید عمل کند و از طرفی در صورت عدم مهار میزان تولید، به عنوان پیش‌سازی برای تولید رادیکال مضر و نکروززای (Necrogenic) هیدروکسیل عمل کند (Bhattacharjee, 2011).

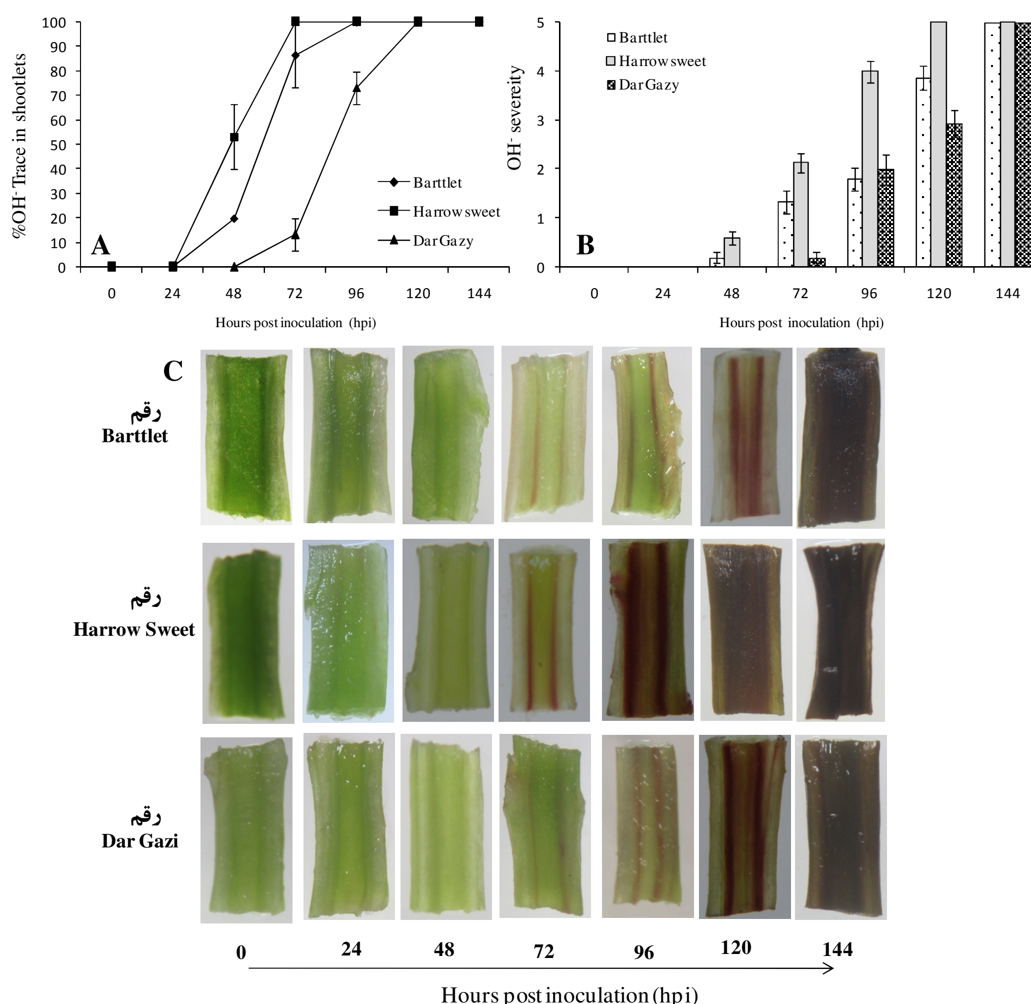
با توجه به نقش آنزیم‌های کاهش دهنده کاتالاز و پراکسیداز در کاهش تجمع پراکسیدهیدروژن، و از طرف دیگر مقایسه رفتار دوگانه و متفاوت دو رقم نیمه مقاوم هاروسوئیت و مقاوم درگزی به تجمع پراکسیدهیدروژن، به نظر می‌رسد دو رقم فوق از رفتار متضادی در این مرحله از تولید گونه‌های فعال اکسیژن به‌ویژه گونه پراکسیدهیدروژن استفاده می‌کنند. به این صورت که، در رقم هاروسوئیت با کاهش نسبی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز، پیش زمینه تجمع نسبی کاتالاز و پراکسیداز فراهم می‌شود، درحالی‌که در رقم درگزی، با افزایش فعالیت این دو آنزیم از تجمع بیش از حد پراکسیدهیدروژن که به عنوان پیش‌ساز رادیکال هیدروکسیل مورد استفاده قرار می‌گیرد، جلوگیری و مانع از ایجاد و پیشرفت نکروز در اثر تولید هیدروکسیل خواهد شد. این فرضیه، بر اساس گزارش آذرآبادی و همکاران (Azarabadi *et al*., 2017) که کاهش تظاهر دو ژن *Cat* و *POX*، به ترتیب کدکننده آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز تنها در رقم هاروسوئیت در ساعات بعد از مایه‌زنی با باکتری عامل بیماری را گزارش کردند، در انطباق است. لیکن در این بررسی رفتار تظاهر این ژن‌ها در ارقام متمایز و مقاوم نظیر رقم درگزی مورد بررسی قرار نگرفته است. در بررسی عرفانی و همکاران (Erfani *et al*., 2014) روی بررسی فعالیت آنزیم‌های کاتلاز و پراکسیداز در ارقام گلابی در پی مایه‌زنی با عامل بیماری آتشک در شرایط گلخانه‌ای، مشاهده شد که فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در رقم بسیار متحمل درگزی اختلاف معنی‌داری در مقایسه با ارقام حساس محمدعلی و ویلیامز در طول دورهٔ مایه‌زنی داشت و در روز ششم بعد از مایه‌زنی، فعالیت این آنزیم‌ها در رقم درگزی به حداکثر خود رسید. بر اساس این تحقیق، در این دوره زمانی، فعالیت دو آنزیم فوق افزایش چندانی در رقم نیه مقاوم هاروسوئیت نداشت. این رفتار متضاد آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در دو رقم نیمه مقاوم هاروسوئیت و مقاوم درگزی در واکنش به حمله عامل بیماری آتشک، بیانگر اتخاذ دو استراتژی متفاوت در دو رقم فوق به منظور ایجاد سد دفاعی در مقابل حمله باکتری *E. amylovora* است. چنانچه مشاهده الگوی بافت‌شناختی مشاهده شده در شکل ۷ نیز مویدی بر گسترش زودهنگام و سریع پراکسیدهیدروژن در کلیه بافت‌های ساقه رقم هاروسوئیت بلافاصله پس از ۲۴ ساعت از حضور باکتری بود، در حالی که اولین رد قابل

توجه و نسبتاً شدید این گونه فعال اکسیژن در رقم درگزی تا ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی به تاخیر افتاد.

تولید و گسترش رادیکال هیدروکسیل

رادیکل هیدروکسیل به عنوان یک رادیکال مضر و ایجاد کننده نکروز (Necrogenic) در بافت‌های زنده و از جمله بافت گیاهان عمل می‌کند. همچنین گیاهان راهی برای مقابله و کاهش سطح این رادیکل پس از تولید با استفاده از روش‌های آنزیمی نداشته و تنها راه مبارزه با اثر مخرب تولید آن، جلوگیری از تولید این رادیکال است (Bhattacharjee, 2011). در این بررسی با توجه به تولید زیادتر پراکسیدهیدروژن در بافت‌های رقم هاروسوئیت، و گزارش‌های فعالیت کم‌تر آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در پی ساعت‌های پس از حمله بیماری آتشک (Azarabadi *et al.*, 2017)، انتظار تولید بیش‌تری از رادیکال هیدروکسیل در این رقم و تولید کم‌تر آن در رقم ویلیامز می‌رفت که نتایج مشاهده شده در شکل ۸ ،تایید کننده این مطلب است. همچنین با توجه به تاخیر در میزان تولید پراکسیدهیدروژن در رقم مقاوم درگزی، انتظار بیش‌ترین تاخیر در تولید رادیکل هیدروکسیل بود که نتایج در این مورد نیز موید این مطلب است. از سوی دیگر، چنانچه ذکر شد انتظار می‌رود حضور و پیشرفت رادیکال هیدروکسیل به دلیل اثر مخرب آن روی بافت‌ها، بیش‌ترین مطابقت را با الگوی ظهور و توسعه نکروز در بافت‌های میزبان داشته باشد که دقیقاً دو الگوی مشاهده شده در شکل ۸ برای توسعه این رادیکال و شکل ۲ برای ظهور و پیشرفت نکروز دارای انطباق صددرصد نیستند. در این رابطه، در رقم هاروسوئیت زودترین گسترش رادیکال هیدروکسیل در طول بافت و با شدت نسبتاً زیادتر در مقایسه با دیگر ارقام دیده شد که با توجه به تاخیر بروز علائم در این رقم و از طرفی نقش نکروززای این رادیکال، این نتایج نشان‌دهنده این است که تنها فاکتور تولید رادیکال هیدروکسیل به عنوان معیاری منحصر به فرد برای ظهور نکروز در بافت‌های مورد تحقیق عمل نکرده است. شاید ساختارهای دفاعی غیرآنزیمی در برابر رادیکال‌های فعال اکسیژن، نظیر انواع ترکیبات فنلی و زیرمجموعه‌های آن‌ها و یا ترکیباتی نظیر اسید آسکوربیک مانع از خسارت‌زائی شدید این رادیکال و تاخیر در بروز نکروز زودهنگام‌تر از رقم ویلیامز در این رقم شده باشد. دو رقم ویلیامز و درگزی نیر با توجه به تاخیر تولید پراکسیدهیدروژن در مقایسه با رقم هاروسوئیت، تولید کم‌تری از رادیکال هیدروکسیل در بافت‌های خود نشان دادند (شکل ۸).

بر پایه نتایج این تحقیق، ارزیابی مقاومت ارقام گلابی به بیماری آتشک در دو شرایط درون‌شیشه و گلخانه‌ای با شاخص‌های متفاوت، لیکن قابل مقایسه با یک‌دیگر امکان‌پذیر است. بدبن صورت که در شرایط درون‌شیشه‌ای سرعت پیشرفت نکروز در شاخه‌چه‌ها و در



شکل ۸- مقایسه سرعت (A) و شدت (B) پیشرفت رادیکال فعال اکسیژن هیدروکسیل ($OH^{\bullet -}$) و الگوی مشاهده شده در بافت‌های ساقه‌چه‌های درون شیشه (C) در ارقام گلابی مورد مطالعه پس از آلوده‌سازی با عامل بیماری آتشک، *Erwinia amylovora* در دوره زمانی ۱۴۴ ساعت پس از مایه‌زنی

Fig. 8. Comparison of velocity (A) and severity (B) of hydroxyl ($OH^{\bullet -}$) radical progress in the tissues of *in vitro* shootlets of studied pear cultivars and pattern of progress (C), following inoculation by fire blight causal agent, *Erwinia amylovora*, up to 144 h post inoculation period

شرایط گلخانه‌ای، پیشرفت نهایی نکروز در سرشاخه‌ها به عنوان ملاک ارزیابی بوده و این ملاک‌ها با میزان مقاومت مشاهده شده در شرایط باغی منطبق است. در این رابطه، رقم درگزی یک رقم با سطح مقاومت بسیار بالا به بیماری بوده که سطح مقاومت بیش‌تری به بیماری حتی نسبت به رقم هاروسوئیت که با این هدف مورد اصلاح و گزینش قرار گرفته است نشان می‌دهد، به صورتی که پیشرفت نهائی نکروز در رقم درگزی بسیار محدود و اغلب به صورت لکه‌ای در محل تزریق باکتری، عامل بیماری متوقف می‌شود.

ارزیابی تولید و الگوی گسترش گونه‌های مختلف رادیکال فعال اکسیژن در برابر حمله بیماری آتشک نشان دهنده الگوی تقریباً یکسان ارقام در رابطه با تولید رادیکال سوپراکسید بود، در حالی که تولید پراکسیدهیدروژن با سطح تحمل رقم در برابر بیماری و شواهد ژنی و آنزیمی قبلی گزارش شده در این رابطه در انطباق کامل بود. نتایج همچنین نشان داد که ارقام گلابی ظاهراً از دو مکانیسم متفاوت برای تحمل به بیماری آتشک استفاده می‌کنند که در مکانیسم اول، با تولید زودهنگام و بیش از حد زیاد پراکسیدهیدروژن، سعی در مهار بیماری کرده و در مکانیسم دوم تلاش در کاهش بیش از حد زیاد پراکسیدهیدروژن و جلوگیری از تولید رادیکال مخرب هیدروکسیل می‌کنند. این‌که چگونه ارقام متحمل گروه اول پس از تولید زیاد پراکسیدهیدروژن و تبدیل آن به رادیکال هیدروکسیل مانع از اثر مخرب این رادیکل می‌شوند، مشخص نیست. بر اساس بررسی‌های قبلی انجام شده روی ارقام مورد بررسی، به نظر می‌رسد رفتار مقاومتی متفاوت مشاهده شده در رقم درگزی، می‌تواند ناشی از منشاء متفاوت آن و فاصله ژنتیکی زیاد آن از ارقام گلابی معمولی بوده باشد، لذا با توجه به سطح مقاومت بالای این رقم به بیماری، لازم است دیگر ارقام دارای منشاء مشابه با دقت بیش‌تری مد نظر قرار داده شوند. علاوه بر این، توصیه می‌شود در ادامه بررسی‌های انجام شده روی ساختارهای دفاع آنزیمی دفاع آنتی‌اکسیداتیو گیاه در برابر حمله باکتری عامل بیماری آتشک که دارای انطباق زیاد با الگوی تولید رادیکال‌های فعال بوده است، ساختارهای دفاع اکسیداتیو غیرآنزیمی در دو سطح تظاهر ژن و بیوشیمایی نیز با دقت فراوان به منظور شناخت بیش‌تر مسیرهای مقاومت در برابر بیماری مورد مطالعه قرار گیرد.

References

Abdollahi, H., 2010. Pear, Botany, Cultivars and Rootstocks. Iranian Agricultural Ministry Publications. Tehran, Iran, 210pp. (in Persian).

Abdollahi, H., Ghahremani, Z., Erfani Nia, K., and Mehrabi, R. 2015. Role of electron transport chain of chloroplasts in oxidative burst of interaction between *Erwinia amylovora* and host cells. Photosynthesis Research 124: 231–242.

Abdollahi, H., Ghasemi, A., and Mehrabipour, S. 2008. Evaluation of fire blight resistance in some quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes, II. Resistance of genotypes to the disease. Seed and Plant 24: 529-541 (in Persian).

Abdollahi, H., and Majidi Heravan, E. 2005. Relation between fire blight resistance and different vegetative and reproductive traits in apple (*Malus domestica* Borkh.)

cultivars. Seed and Plant 21: 501-513 (in Persian).

Abdollahi, H., Muleo, R., and Rugini, E. 2005. Study of basal growth media, growth regulators and pectin effects on micropropagation of pear (*Pyrus communis* L.) cultivars. Seed and Plant 21: 373-384 (in Persian).

Abdollahi, H., Ruzzi, M., Rugini, E., and Muleo, R. 2004. *In vitro* system for studying the interaction between *Erwinia amylovora* and genotypes of pear. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 79: 203-212.

Ahmadi, S., Alipour, M., Abdollahi, H., and Atashkar, D. 2013. Comparison of efficiency of indices for fire blight susceptibility evaluation in quince (*Cydonia oblonga* Mill.) in orchard condition. Seed and Plant Improvement Journal 29-1: 331-347 (in Persian).

Aldwinckle, H. S., and Preczewski, J. L. 1976. Reaction of terminal shoots of apple cultivars to invasion by *Erwinia amylovora*. Phytopathology 66: 1439–1444.

Ali, B., and Kazempour, M. N. 2004. Presentation of *Erwinia amylovora* from Guilan province. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz, Iran. Page 422 (in Persian).

Azarabadi, S. R. 2014. Assessment of resistance and survey on some tolerance mechanisms to fire blight (*Erwinia amylovora*) in some new pear cultivars and rootstocks. MSc. Thesis, College of Agriculture, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran. 153pp. (in Persian).

Azarabadi, S., Abdollahi, H., Torabi, M., Salehi, Z., and Nasiri, J. 2017. ROS generation, oxidative burst and dynamic expression profiles of ROS-scavenging enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in response to *Erwinia amylovora* in pear (*Pyrus communis* L). European Journal of Plant Pathology 147: 279-294.

Bhattacharjee, S. 2011. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. pp. 1-30. In: Dutta Gupta, S. (ed.). Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Davoudi, A. 1998. Evaluation of fire blight resistance in some apple and pear cultivars. MSc. Thesis, University of Tabriz, Tabriz, Iran. 200pp. (in Persian).

Davoudi, A., Majidi Heravan, E., Rahimian, H., and Valizade, M. 2005. The intensity of disease of pear cultivars to fire blight with use the standard system of

USDA. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, Water and Soil Science 9: 159-168 (in Persian).

Erfani, J., Abdollahi, H., Ebadi, A., Fatahi Moghadam, M. R., and Arzani, K. 2013. Evaluation of fire blight resistance and the related markers in some European and Asian pear cultivars. Seed and Plant Improvement Journal 29-1: 659-672 (in Persian).

Erfani, J., Ebadi, A., Abdollahi, H., and Fatahi Moghadam, M. R. 2012. Genetic diversity of some pear cultivars and genotypes using simple sequence repeat (SSR) markers. Plant Molecular Biology Reporter 30: 1065–1072.

Erfani, J., Ebadi, A., Abdollahi, H., and Fatahi Moghadam, M.R. 2014. Investigation of changes in antioxidant enzyme and total phenol level in some pear cultivars inoculated with fire blight disease. Iranian Journal of Horticultural Science 45: 127-136 (in Persian).

Gowda, S. S., and Goodman, R. N. 1970. Movement and persistence of *Erwinia amylovora* in shoot, stem and root of apple. Plant Disease Reporter 54: 576–580.

Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. 1999. The Chemistry of Free Radicals and Related Reactive Species. Oxford University Press, Oxford, UK. 704pp.

Klein, S. M., Cohen, G., and Cederbaum, A. L. 1981. Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical generating systems. Biochemistry 20: 6006-6012.

Leblay, C., Chevreau, E., and Robin, L.M. 1991. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivar (*Pyrus communis* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 25: 99-105.

Le Deunff, E., Davoine, C., Le Dantec, C., Billard, J. P., and Huault, C. 2004. Oxidative burst and expression of *germin/oxo* genes during wounding of ryegrass leaf blades: comparison with senescence of leaf sheaths. Plant Journal 38: 421-431.

Maleki Balajoo, O., Keshavarzi, M., Rezaee-Danesh, Y., Damyar, S., and Jaafari, M. 2011. Fire blight resistance in a number of local Iranian apple germplasm. Seed and Plant Improvement Journal 27-1: 25-36 (in Persian).

Maroofi, A., and Mostafavi, M. 1996. Evaluation of the resistance of apple, pear and quince varieties to fire blight. Acta Horticulturae 411: 395-400.

Mazarei, M., Zakeri, Z., and Hassanzadeh, N. 1994. Fire blight situation on fruit trees in West Azerbaijan and Ghazvin provinces. Iranian Journal of Plant Pathology

30: 25-32 (in Persian).

Mehrabipour, S., Abdollahi, H., and Ghasemi, A. A. 2010. Study of rootstock role on susceptibility of some quince genotypes to fire blight disease. Applied Entomology and Phytopathology 78: 26-42. (in Persian).

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Nourmohammadi, N., Abdollahi, H., Moeini, A., and Roohalamin, E. 2015. Effects of growth media and Fe source on micropropagation and rooting of semi-dwarf pear rootstocks, Pyrodwarf and OH×F87. Seed and Plant Production Journal 31-2: 265-278 (in Persian).

Oh, C. S., and Beer, S. V. 2005. Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. FEMS Microbiology Letters 253:185-192.

Oh, C. S., Carpenter, S. C. D., Hayes, M. L., and Beer, S. V. 2010. Secretion and translocation signals and DspB/F-binding domains in the type III effector DspA/E of *Erwinia amylovora*. Microbiology 156: 1211–1220.

Quoirin, M., and Lepoivre, P. 1977. Etude de mileux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. Acta Horticulturae 78: 437-442.

Sahandpour, A., and Ghasemi, A. 2004. Occurrence of the fire blight of pome trees in Fars province. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz, Iran, Page 429 (in Persian).

Steiner, P. W. 2000. Integrated orchard and nursery management for the control of fire blight. pp. 339-358. In: Vanneste, J. L. (ed.). Fire Blight: the Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. CAB International Press, Wallingford, UK.

Tahzibi Hagh, F., and Abdollahi, H. 2009. Histological and pomological characterization of sclereid cell clusters in some Iranian local and European pear cultivars. Acta Horticulturae 877: 765-769.

Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wie, Y., and Collinge D. B. 1997. Subcellular localization of H_2O_2 in plants, accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley- powdery mildew interaction. Plant Journal 11: 1187-94.

van Der Zwet, T., and Keil, H. L. 1979. Fire Blight: A Bacterial Disease of Rosaceous Plants. United States Department of Agriculture, Agricultural Handbook No. 510, Washington D.C., USA. 650pp.

Venisse, J. S., Guller G., and Brisset M. N. 2001. Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. Plant Physiology 125: 2164-2172.

Xie, Z., and Chen, Z. 2000. Harpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. Molecular Plant Microbe Interaction 13:183-190.

Zakeri, Z., and Sharif Nabi, B. 1991. Fire blight disease in Karaj. Proceedings of the 10th Iranian Plant Protection Congress, Kerman, Iran. page 157 (in Persian).

Zohur, A., and Rahmani Moghadam, N. 2004. Outbreak of fire blight in Khorasan province. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz, Iran. Page 423 (in Persian).